

## Method for the modification, in particular the polymerisation, of haemoglobin in vitro

**Patent number:** DE3714351  
**Publication date:** 1988-11-17  
**Inventor:** BARNIKOL WOLFGANG PROF DR DR (DE); BURKHARD OSWALD DR (DE)  
**Applicant:** BARNIKOL WOLFGANG (DE); BURKHARD OSWALD (DE)  
**Classification:**  
- **international:** C07K14/805; A61K38/00; C07K14/795; A61K38/00; (IPC1-7): C07K15/22; A61K37/14; C07K3/08; C07K3/20; C07K3/26; C12P21/00  
- **europen:** C07K14/805  
**Application number:** DE19873714351 19870429  
**Priority number(s):** DE19873714351 19870429

[Report a data error here](#)

### Abstract of DE3714351

The invention relates to a method for the modification, in particular the polymerisation, of haemoglobin in which the reaction is carried out in vitro with intact erythrocytes. It is possible in this way by using the agents known per se to alter the oxygen affinity. The modification, in particular the polymerisation, of haemoglobin can be carried out by the action of polyfunctional agents, preferably in isotonic solution. It is possible to use as polymerising agent, for example, glutaraldehyde. Animal erythrocytes, in particular bovine erythrocytes, can be used as starting material. It is possible to break down blood-group-active molecular structures on the erythrocyte surface by means of enzymes, for example neuraminidase. The method according to the invention results, for example, in polymers with a molecular weight of 60000 to more than  $6 \times 10^6$  dalton which have high oxygen transport capacity and low methaemoglobin content.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 37 14 351 A1

⑯ Aktenzeichen: P 37 14 351.4  
⑯ Anmeldetag: 29. 4. 87  
⑯ Offenlegungstag: 17. 11. 88

⑯ Int. Cl. 4:  
**C 07 K 15/22**  
C 07 K 3/08  
C 07 K 3/26  
C 07 K 3/20  
A 61 K 37/14  
C 12 P 21/00

Behördeneingangsturm

DE 37 14 351 A1

⑯ Anmelder:

Barnikol, Wolfgang, Prof. Dr. Dr., 6500 Mainz, DE;  
Burkhard, Oswald, Dr., 6761 Kriegsfeld, DE

⑯ Vertreter:

Ratzel, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 6800  
Mannheim

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

⑯ Verfahren zur Modifikation, insbesondere zur Polymerisation von Hämoglobin in vitro

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifikation, insbesondere zur Polymerisation des Hämoglobins, bei dem man die Reaktion in vitro mit intakten Erythrozyten durchführt. Dabei kann mittels an sich bekannter Agenzien die Sauerstoff-Affinität verändert werden. Die Modifikation, insbesondere die Polymerisation des Hämoglobins, kann durch Einwirkung polifunktioneller Agenzien vorzugsweise in isotonischer Lösung durchgeführt werden. Als Polymerisationsmittel kann beispielsweise Glutardialdehyd eingesetzt werden. Als Ausgangsmaterial können Tier-Erythrozyten, insbesondere Rinder-Erythrozyten, verwendet werden. Es können blutgruppenaktive molekulare Strukturen der Erythrozyten-Oberfläche mittels Enzymen, beispielsweise mittels Neurominidase, abgebaut werden. Beim erfindungsgerümsen Verfahren erhält man beispielsweise Polymerisate mit einem Molekulargewicht von 60000 bis mehr als  $6 \cdot 10^6$  Dalton, die hohe Sauerstofftransportfähigkeit und geringen Met-Hämoglobin-Gehalt aufweisen.

DE 37 14 351 A1

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Modifikation von Hämoglobin, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion in vitro mit intakten Erythrozyten durchführt. 5

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hämoglobin polymerisiert wird.

3. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sauerstoff-Affinität mittels an sich bekannter Agenzien verändert wird. 10

4. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, daß man das Hämoglobin durch Einwirkung polifunktioneller Agenzien polymerisiert.

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation, insbesondere die Polymerisation in isotonischer Lösung durchgeführt wird. 15

6. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hämoglobin bei der Modifikation, insbesondere bei der Polymerisation in hochkonzentrierter Lösung vorliegt. 20

7. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Hämoglobin-Konzentrationen größer als 20 g/dl modifiziert, insbesondere polymerisiert.

8. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Hämoglobin-Konzentrationen größer als 30 g/dl modifiziert, insbesondere polymerisiert.

9. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Erythrozyten nach der Modifizierung, insbesondere nach der Polymerisation in hypotonischer Lösung hämolsiert.

10. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Produkte der Modifizierung, insbesondere die Polymerivate durch Gelfiltration, Ultrafiltration oder Chromatographie reinigt.

11. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Modifikation, insbesondere die Polymerisation zur Erhöhung der Hämoglobinkonzentration an geschrumpften Erythrozyten durchführt.

12. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation, insbesondere die Polymerisation im oxygenierten und/oder desoxygenierten Zustand des Hämoglobins durchgeführt wird. 45

13. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, daß man im Hämatokrit-Bereich von 0,1 bis 99,9% arbeitet. 50

14. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, daß man im Hämatokrit-Bereich von 1 bis 40% arbeitet.

15. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 14, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Temperaturen von 4°C bis 40°C arbeitet.

16. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 15, dadurch gekennzeichnet, daß man der Modifikation, insbesondere der Polymerisation ein reduktives Substrat zusetzt. 60

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als reduktives Substrat Glutathion in reduzierter Form verwendet.

18. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Polymerivate mit einem Molekulargewicht von 60 000 bis mehr als  $6 \times 10^6$  Dalton herstellt. 65

19. Verfahren nach Ansprüchen 2 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß Glutardialdehyd als Polymerisationsmittel verwendet wird.

20. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß blutgruppenaktive molekulare Strukturen in der Erythrozyten-Oberfläche mittels Enzymen abgebaut werden.

21. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 20, dadurch gekennzeichnet, daß die blutgruppenaktiven molekularen Strukturen mit Neurominidase als Enzym abgebaut werden.

22. Verfahren nach Ansprüchen 1 – 19, dadurch gekennzeichnet, daß Tier-Erythrozyten als Ausgangsmaterial verwendet werden.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß Rinder-Erythrozyten als Ausgangsmaterial verwendet werden.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifikation insbesondere zur Polymerisation von Hämoglobin in vitro.

Chemische Modifikationen am Hämoglobin, z. B. 25 Veränderung der Sauerstoff-Affinität oder Polymerisation des Moleküls, werden unter anderem vorgenommen, um geeignete sauerstofftransportierende Blutersatzlösungen herzustellen.

Bekanntlich können solche Lösungen im Katastrophenfall, also beispielsweise bei einem Operationszwi- 30 schenfall mit schwer zu beherrschenden Blutungen, bei Unfällen unter Blutverlust oder für den Fall eines Infektionsrisikos (Hepatitis, AIDS = Aquiertes Immun-Defekt-Syndrom) als Ersatz für eine momentan nicht verfügbare passende Blutkonserve infundiert werden; dies gilt insbesondere dann, wenn ein Mensch z. B. in den 35 genannten Fällen in einen Volumen-Mangel-Schock geraten ist. Ein künstlicher Blutersatz ist, gegenüber einer Blutkonserve, auch für den Fall günstiger, wenn die Gefahr einer immunologischen Überreaktion besteht.

Es ist möglich, daß eine sauerstoffübertragende Blutersatzlösung einen Volumen-Mangel-Schock eher durchbrechen kann, als eine Blutkonserve, da die Erythrozyten bekanntlich in der Konserve versteift sind und dadurch eine verringerte Kapillardurchgängigkeit aufweisen. Ferner ist zu erwarten, daß auch chronische Durchblutungsstörungen (beispielsweise koronare, cerebrale und periphere) mit Hilfe geeigneter Polyhämoglobinlösungen wirksam bekämpft werden können.

An Tiersversuchen ist gezeigt worden, daß mit sauerstoffübertragenden Blutersatzlösungen ein Volumen-Mangel-Schock wirksamer bekämpft werden kann als mit einfachen Plasmaexpandern (Übersichtliche Literaturstelle hierzu: R. Pabst, Med. Klin. 72 (1977), Seiten 1555 bis 1562).

Zur Herstellung sauerstofftragender Blutersatzmedien sind bereits verschiedene Wege beschritten worden, nämlich

1. Verwendung von Emulsionen von Fluorkohlenwasserstoffen, in welchen der Sauerstoff sehr gut löslich ist (Übersichtliche Literaturstelle hierzu: Hirlinger et al., Anaestesist 31 (1982), Seiten 660 bis 666).

2. Die Mikroverkapselung konzentrierter Hämoglobinlösungen in Phospholipid-Vesikeln (Literaturstelle hierzu: Gaber et al., Encapsulation of Hämoglobin in Phospholipid Vesicles; Preparation

and Properties of a Red Cell Surrogate in "The Red Cell, Sixth Ann Arbor Conference", G. J. Brewer (Herausgeber), Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, Seiten 179 bis 190, sogenannte "künstliche Erythrozyten".

3. Herstellung geeigneter Hämoglobinlösungen, auch unter kovalenter Bindung des Hämoglobins an Dextrane.

Die DE-OS 24 17 619 beschreibt beispielsweise polymerisiertes, verknüpftes Hämoglobin als Plasmaprotein-Ersatz, wobei dicarboxyliert verknüpftes Hämoglobin hergestellt wird.

Die DE-OS 27 14 252 beschreibt pyridoxalphosphatverknüpftes Hämoglobin.

Die DE-OS 30 29 307 betrifft ein Blutersatzmittel, hergestellt durch kovalente Verknüpfung von Polysaccharid, beispielsweise Dextran, mit zellfreiem Hämoglobin.

Die BE-PS 8 38 933 beschreibt ein wasserlösliches, verknüpftes, polymerisiertes Hämoglobin, das hergestellt wird durch Umsetzung freien Hämoglobins mit einem polifunktionellen verknüpfenden Agens und anschließendem Abstoppen der Reaktion mit einem inaktivierenden Mittel. Es wird ein polymerisiertes Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 64 000 bis 1 000 000 Dalton erhalten.

Die US-PS 40 01 401 betrifft Poly-Hämoglobin, ein verknüpftes Hämoglobin, als Blutersatz und Plasmaexpander, mit einem Molekulargewicht von 64 000 bis zu 1 000 000 Dalton. Als verknüpfende Agenzien werden Glutardialdehyd, Hexamethylen-diisocyanat oder Butadien-diepoxyd verwendet.

Diese bekannten Verfahren können zumindest in gewisser Hinsicht nicht befriedigen.

So ist es beispielsweise beim Verfahren der US-PS 40 01 401 erforderlich, Amine zur Verhinderung der Entstehung unlöslicher Produkte vor Zugabe des Verknüpfungsmittels zuzugeben.

Außerdem werden unzureichend polymerisierte Polyhämoglobine erhalten.

Bei Anwendung von Fluorkohlenwasserstoffen wurden gewebliche Reaktionen festgestellt (siehe oben bei Hirlinger et al.).

Mit Hämoglobin-Vesikeln gelangen erst jetzt die ersten Tierversuche (Science 230 (1985), 1165–1166). Im letzten Fall besteht die Gefahr einer Lipid-Überbelastung des Organismus durch vesikelbildende Lipoide. Die besten Aussichten auf eine erfolgreiche Anwendung sind Hämoglobin-Lösungen einzuräumen.

Jedoch stehen einer routinemäßigen klinisch-praktischen Nutzung von Hämoglobinlösungen bisher jeweils mehr oder weniger fünf verschiedene Probleme entgegen, nämlich:

1. Erhöhung der Sauerstoffaffinität (zu geringer Halbsättigungsdruck,  $P_{50}$ ), so daß der in der Lunge aufgenommene Sauerstoff nur ungenügend an das Gewebe abgegeben werden kann; dies tritt ausgeprägt bei der kovalenten Bindung des Hämoglobins an Dextran auf.

2. Zu geringe Verweildauer des Hämoglobins im Gefäßsystem, Ausscheidung über die Niere.

3. Mit dem unter (2) aufgezeigten Nachteil ist ferner ein intravasaler Volumenmangel verbunden, so daß man gerade das erzeugt, was man bekämpfen will;

4. Nephrotoxizität und

5. Stimulierung des Immunsystems sowie Besetzung der phagozytierenden Kapazität des retikuloendothelialen Systems durch das infundierte Hämoglobin.

Es wurde gezeigt, daß zur Einstellung eines hohen gemischt venösen  $O_2$ -Partialdruckes nicht so sehr ein hoher Halbsättigungsdruck ( $P_{50}$ ) erforderlich ist (ein  $P_{50}$  von 15 mmHg ist nämlich ausreichend), als vielmehr eine hohe Sauerstoffbindungs Kapazität im Plasma, d.h. eine hohe Massenkonzentration des Hämoglobins (Literaturstelle hierzu: Moss et al., "Hemoglobin Solution-From Tetramer to Polymer", in "The Red Cell: Sixth Ann Arbor Conference", G.J. Brewer (Herausgeber), Seiten 191 bis 220, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984). Zudem wurde durch Tierversuche gezeigt, daß eine kovalente Verknüpfung der Untereinheiten — so, daß eine Dissoziation unterbunden ist — sowie eine Polymerisation des Hämoglobins zu einer Erhöhung der Verweildauer führt (Biochim. Biophys. Acta 874 (1986), 76–81 und Surgery, Gynecology & Obstetrics 161 (1985), 563–569).

Aus den Darlegungen geht hervor, daß natives Hämoglobin zur Herstellung sauerstofftransportierender Lösungen nicht brauchbar ist, sondern daß es chemisch modifiziert werden muß. Das erfordert aufwendige und kostspielige biochemische Verfahren im großtechnischen Maßstab (z. B. Kühlung, d.h. Arbeiten bei tiefen Temperaturen). Zudem wird das empfindliche Hämoglobinmolekül dabei denaturiert und oxidiert. Dadurch verliert es seine Fähigkeit, den Sauerstoff reversibel zu binden. Im Organismus ist Hämoglobin gegen die Oxidation durch ein intraerythrozytares Reduktase-System geschützt, dessen wichtiges Substrat die reduzierte Form des Glutathions ist. Normalerweise liegen im zirkulierenden Blut 1 bis 2% des Hämoglobins oxidiert vor (Met-Hb). Wegen der mit jeder biochemischen Manipulation an Lösung einhergehenden Met-Hb-Bildung wurden von anderen reduzierende Substanzen zugesetzt, zum Beispiel Ascorbinsäure (Vitamin C) (Surgery, Gynecology & Obstetrics 161 (1985), 563–569). Trotz dieser Maßnahmen und des Aufwandes ist es nicht gelungen Hämoglobin-Lösungen mit weniger als 5% Met-Hb herzustellen.

In den letzten Jahren ist das Aufkommen der Blutkonserven immer geringer geworden und es ist wichtig, Alternativen dafür zu schaffen. Als Ausgangsmaterial kommen insbesondere Rinder-Erythrozyten in Frage. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß das zu schaffende neue Verfahren zur Modifikation, insbesondere zur Polymerisation des Hämoglobins auch auf Tier-Erythrozyten anwendbar ist.

Vorliegender Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Modifikation, insbesondere zur Polymerisation von Hämoglobin zu liefern, das ein hochvernetztes Hämoglobin mit hoher Sauerstofftransportfähigkeit und geringem Met-Hämoglobin-Gehalt liefert.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß bei einem Verfahren zur Modifikation, insbesondere zur Polymerisation des Hämoglobins dadurch gelöst, daß man die Reaktion in vitro mit intakten Erythrozyten durchführt.

Besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet,  
daß das Hämoglobin polymerisiert wird,  
daß die Sauerstoff-Affinität mittels an sich bekannter Agenzien verändert wird,  
daß man das Hämoglobin durch Einwirkung polifunktioneller Agenzien polymerisiert,

daß die Modifikation, insbesondere die Polymerisation in isotonischer Lösung durchgeführt wird,  
daß das Hämoglobin bei der Modifikation, insbesondere bei der Polymerisation in hochkonzentrierter Lösung vorliegt,

daß man bei Hämoglobin-Konzentrationen größer als 20 g/dl modifiziert, insbesondere polymerisiert,  
daß man bei Hämoglobin-Konzentrationen größer als 30 g/dl modifiziert, insbesondere polymerisiert.

Weitere besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet,

daß man die Erythrozyten nach der Modifizierung, insbesondere nach der Polymerisation in hypotonischer Lösung hämolsiert,

daß man die Produkte der Modifizierung, insbesondere die Polymerisate durch Gelfiltration, Ultrafiltration oder Chromatographie reinigt,

daß man die Modifikation, insbesondere die Polymerisation zur Erhöhung der Hämoglobinkonzentration an geschrumpften Erythrozyten durchführt,

daß die Modifikation, insbesondere die Polymerisation im oxygenierten und/oder desoxygenierten Zustand des Hämoglobins durchgeführt wird,

daß man im Hämatokrit-Bereich von 0,1 bis 99,9% arbeitet,

daß man im Hämatokrit-Bereich von 1 bis 40% arbeitet,

daß man bei Temperaturen von 4°C bis 40°C arbeitet.

Außerdem sind weitere besondere Ausführungsformen dadurch gekennzeichnet,

daß man der Modifikation, insbesondere der Polymerisation ein reduktives Substrat zusetzt,

daß man als reduktives Substrat Glutathion in reduzierter Form verwendet,

daß man Polymerisate mit einem Molekulargewicht von 60 000 bis mehr als  $6 \times 10^6$  Dalton herstellt,

daß Glutardialdehyd als Polymerisationsmittel verwendet wird,

daß blutgruppenaktive molekulare Strukturen in der Erythrozyten-Oberfläche mittels Enzymen abgebaut werden,

daß die blutgruppenaktiven molekularen Strukturen mit Neurominidase als Enzym abgebaut werden,

daß Tier-Erythrozyten als Ausgangsmaterial verwendet werden,

daß Rinder-Erythrozyten als Ausgangsmaterial verwendet werden.

Es handelt sich bei vorliegender Erfindung um ein Verfahren zur chemischen Modifikation des Hämoglobins in vitro, bei welchem das Hämoglobin intrazellulär (im Erythrozyten) vorliegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren liefert die besonderen Vorteile zur Verbesserung und Verbilligung des Verfahrens die notwendigen chemischen Modifikationen, welche zur Herstellung geeigneter sauerstofftransportierender Hämoglobinklösungen erforderlich sind, im intakten Erythrozyten durchzuführen, z. B. Verringerung der Sauerstoff-Affinität oder eine Polymerisation. Dies hat zugleich den Vorteil, daß Hämoglobin kompakt zu den erforderlichen hohen Polymerisationsgraden polymerisiert werden kann (siehe EP-Anmeldung 8 51 06 057.4). Um das Reduktase-System dabei in Gang zu halten kann reduktives Substrat, z. B. Glutathion in reduzierter Form zugesetzt werden.

Erst nach der chemischen Modifikation wird das Hämoglobin aus den Zellen befreit, z. B. durch osmotische Hämolyse. Bei direkter Wirkung der Agenzien auf die Erythrozyten ist mit dem Entstehen schädlicher Nebenprodukte zu rechnen, z. B. Fieber erzeugende Substan-

zen (Pyrogene) oder Immunogene. Bekanntlich ist Sitz der Immunogene die Glycocalix auf der Außenseite der Erythrozyten-Membran. Die Glycocalix kann vor oder nach der chemischen Modifikation abgebaut werden,

5 z. B. enzymatisch durch Neuaminidase. Die möglicherweise entstehenden schädlichen Substanzen können in einem nachgeschalteten Reinigungsverfahren entfernt werden, z. B. durch Chromatographie oder Ultrafiltration. Letzteres ist großtechnisch besonders einfach und kostengünstig und es ist bekannt, daß schädliche Substanzen kleinere Moleküle sind. Durch ein Abfiltrieren des Roh-Hämolsats, z. B. mit einer Trenngrenze von 300 000 Dalton können so in einem Arbeitsgang erstens niedermolekulare schädliche Substanzen eliminiert und das Rohpolymerisat von den unerwünschten niedermolekularen Polymeren befreit werden. Ferner können im gleichen Arbeitsgang auf diese Weise für die Durchführung der Reaktion notwendige Agenzien quantitativ wieder aus der Lösung entfernt werden. Der Vorteil des Verfahrens ist ferner, daß, wie das Beispiel 2 zeigt, verfallene Blutkonserven verwendet werden können.

Die Möglichkeit, die Polymerisation direkt am intakten Erythrozyten durchzuführen, macht eine vorhergehende aufwendige biotechnologische Präparation der hochkonzentrierten Hämoglobinklösung überflüssig, womit man auch eine unerwünschte Bildung von inaktivem Met-Hämoglobin vermeidet.

Das Wesen vorliegender Erfindung wird nun anhand der folgenden Ausführungsbeispiele, die bevorzugte Ausführungsformen zeigen, weiterhin erläutert:

#### Beispiel 1

##### Polymerisation im analytischen Maßstab:

35 Blut wird von einem gesunden Menschen aus einer Vene entnommen und mit Heparin ungerinnbar gemacht. Die Erythrozyten werden zur Entfernung des Plasmas mit isotonischer Natriumchloridlösung (0,9 g/dl) zwei- bis dreimal unter Zentrifugieren gewaschen. Zum Schluß erfolgt eine scharfe Zentrifugation (15 Minuten bei 15 000 g), damit die Erythrozyten dicht gepackt sind. In ein 50 ml-Becherglas mit Magnetührer werden bei 22°C 0,33 ml 1,8%ige Glutardialdehydlösung gegeben. Unter Rühren (200 Umdrehungen pro Minute) werden in einem Guß 10 ml einer 10%igen (Volumenteil) Erythrozytensuspension hinzugegeben. Die Zellen waren suspendiert in folgender Elektrolytlösung: Natriumbicarbonat 20 mmol/l; NaCl 125 mmol/l; KCl 4,5 mmol/l. Es wurde 25 Minuten gerührt, danach 5 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert. Die gepackten Erythrozyten wurden unter Rühren in 10 ml Wasser 3 Stunden lang hämolsiert. Dann wurde die Lösung 10 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert. Die Ausbeute an Hämoglobin in der überstehenden klaren Lösung betrug 87%. Das Molekulargewicht, ermittelt durch Gelfiltration an Sephadryl 400 (Deutsche Pharmacia, Freiburg, BR Deutschland, (Gewichtsmittel) war mindestens  $4,9 \times 10^6$  Dalton. Für die Gelchromatographie wurde die Lösung vorher durch 0,22 µm-Filter filtriert. Polymerisate dieser Art, polymerisiert im oxygenierten Zustand weisen einen Halbsättigungsdruck ( $P_{50}$ ) von 9 mmHg auf und polymerisiert im desoxygenierten Zustand einen solchen von 13 mmHg (pH = 7,4, Temperatur = 37°C). (siehe Offenlegungsschrift EP-8 51 06 057.4).

## Beispiel 2

## Polymerisation im Liter-Maßstab:

Blut einer verfallenen Blutkonserve wird 5mal mit 5 isotonischer Elektrolytlösung (125 mmol/l NaCl, 4,5 mmol/l KCl, 20 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>) gewaschen. Mit den gewaschenen Erythrozyten wurde 300 ml einer Suspension (Medium siehe oben) hergestellt, welche einen Hä- 10 moglobingehalt von 2,7 g/dl hatte. Die Suspension wurde in einen 1 l-Rundkolben eingebracht und mit einem KPG-Rührer unter 200 Umdrehungen pro Minute ge- rührt. Dazu wurden zügig 10 ml einer 1,7%igen Glutar- 15 dialdehydlösung gegeben. Die Rühr- und Reaktionszeit betrug 25 Minuten. Nach Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen pro Minute, 15 Minuten lang, wurde der Überstand abdekantiert und die Erythrozyten mit demi- 20 neralisiertem Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Das Ge- misch wurde 3 Stunden lang mit Hilfe eines Magnetrührers geführt, danach mit 15 000 g zentrifugiert und der 25 Hämaglobingehalt der überstehenden klaren Lösung bestimmt. Die Ausbeute des löslichen Hämaglobins be- trug 95%. Das lösliche Produkt besaß ein mittleres Mo- lekulargewicht (Gewichtsmittel) von  $6,4 \times 10^6$  Dalton. Es wurde an einem Sephacryl 400-Gel (Deutsche Pharma- 25 cia, Freiburg, BR Deutschland) bestimmt.

30

35

40

45

50

55

60

65

**- Leerseite -**